**La sonde nucléique**

**Définition :** C’est une courte séquence d’acide nucléique **marquée** utilisée pour hybrider et détecter des séquences homologues, elles doivent être spécifiques et sensibles et ne s’associent qu’avec une séquence complémentaire.

**Type de marquage:**

* **Marquage radioactif :** par utilisation des isotopes32P**, 35S, 3H**
* **Marquage froid :** qui utilisent des molécules aux propriétés fluorescentes

- **direct :** les nucléotides sont modifiés par un fluorophore, Groupe chimique qui fluoresce quand il est exposé à une longueur d’onde donnée.

 **- indirect** – nucléotide marqué par un reporter qui sera repéré par une molécule affine.

**Stratégies de marquage:**

* Nick translation:(ADNase, ADN pol I)
* Multi-amorçage au hasard ou Random-priming
* Marquage en 5’
* Marquage en 3’

**Nick translation :** La méthode de Nick translation a été la première méthode développée pour incorporer des nucléotides radiomarqués dans l'ADN ( Rigby et al., 1977 ) , La procédure repose sur la réparation de cassures (nicks) simple brin dans l’ADN, Cette cassure peut être obtenue en utilisant une endonucléase ADNase I. La cassure ainsi exposée va alors servir de point de départ pour l’introduction de nouveaux nucléotides en utilisant l’ADN polymérase, une enzyme composée de nombreuses sous- unités qui possède des activités d’ADN polymérase et d’exonucléase 5′ → 3′. Alors que l’ADN polymérase ajoute de nouveaux nucléotides marqués à l’extrémité 3′- hydroxyle de la cassure, les nucléotides sont supprimés à l’autre extrémité de la cassure par l’activité exonucléasique 5′ → 3′ de la même enzyme. La cassure est ainsi progressivement déplacée le long de l’ADN dans la direction 5′ → 3′.

Si la réaction est réalisée à une température relativement faible (environ 15 °C), elle ne se poursuit par au- delà du renouvellement complet de la séquence nucléotidique existante. Bien qu’il n’y ait pas de synthèse nette d’ADN à cette température, la réaction de synthèse permet l’incorporation de nucléotides marqués à la place de ceux qui existaient précédemment dans le nucléotide non marqué.



**Multi-amorçage au hasard ou Random-priming :** La technique de marquage de l’ADN à l’aide d’amorces aléatoires repose sur l’hybridation d’un mélange de nombreux amorces différents qui se lient au hasard à des séquences complémentaires de l’ADN matrice dénaturé, et initient la synthèse de nouveaux brins d’ADN.

 La synthèse des nouveaux brins complémentaires à l’aide des nucléotides marqués est catalysée par le fragment Klenow de l’ADN polymérase I d’*E. coli* (qui contient l’activité de polymérase sans l’activité exonucléasique 5′ → 3′ associée).



**Marquage à l’extrémité 5’ :** La polynucléotide kinase catalyse le transfert du phosphate de l’ATP sur une fonction alcool du carbone 5’ d’un ADN ou d’un ARN. La séquence a marqué doit subir une déphosphorylation par la phosphatase alcaline.



**Marquage en 3’ :** La transférase terminale catalyse l’addition de désoxynucléotides sur une fonction alcool 3’OH terminale de l’ADN. Il suffit d’utiliser les nucléotides marqués.